

**$\alpha$ -半乳糖苷酶 ( $\alpha$ -Galactosidase,  $\alpha$ -GAL) 试剂盒说明书**

微量法 100管/48样

正式测定前务必取2-3个预期差异较大的样本做预测定

测定意义：

$\alpha$ -GAL (EC 3.2.1.22)广泛存在于动物、植物、微生物和培养细胞中，能专一地催化 $\alpha$ 半乳糖苷键的水解，主要参与棉子糖、水苏糖、蜜二糖和半乳甘露聚糖等半乳糖苷的降解。 $\alpha$ -GAL对于植物种子的萌发至关重要，种子萌发初期，其催化产生的D-半乳糖通过糖酵解途径迅速转化和消耗，为种子的萌发提供最初的能量来源，后期则主要参与细胞壁储藏多糖水解。

测定原理：

$\alpha$ -GAL分解对-硝基苯- $\alpha$ -D-吡喃半乳糖苷生成对-硝基苯酚，后者在400nm有最大吸收峰，通过测定吸光值升高速率来计算 $\alpha$ -GAL活性。

自备用品：

可见分光光度计/酶标仪、台式离心机、水浴锅、可调式移液器、微量石英比色皿/96孔板、研钵、冰和蒸馏水。

试剂组成和配制：

提取液：液体100mL×1瓶，4°C保存。

试剂一：粉剂×1瓶，-20°C保存；临用前加入2.5mL蒸馏水，充分溶解备用；用不完的试剂仍-20°C保存。

试剂二：液体4mL×1瓶，4°C保存。

试剂三：液体13mL×1瓶，4°C保存。

粗酶液提取：

1、细菌或培养细胞：先收集细菌或细胞到离心管内，离心后弃上清；按照细菌或细胞数量（10<sup>4</sup>个）：提取液体积（mL）为500~1000：1的比例（建议500万细菌或细胞加入1mL提取液），超声波破碎细菌或细胞（冰浴，功率20%或200W，超声3s，间隔10s，重复30次）；15000g 4°C离心10min，取上清，置冰上待测。

2、组织：按照组织质量（g）：提取液体积(mL)为1：5~10的比例（建议称取约0.1g组织，加入1mL提取液），进行冰浴匀浆。15000g 4°C离心10min，取上清，置冰上待测。

测定步骤：

1. 分光光度计或酶标仪预热30min以上，调节波长至400nm，蒸馏水调零。

2. 样本测定（在EP管或96孔板中依次加入下列试剂）：

试剂名称（ $\mu$ L）	测定管	对照管
试剂一	25	
蒸馏水		25
试剂二	35	35
样本	10	10

迅速混匀，放入37°C保温30min

试剂三	130	130
-----	-----	-----

充分混匀，400nm处测定吸光值A，计算 $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ 。每个测定管需设一个对照管。

$\alpha$ -GAL活性计算：

a.用微量石英比色皿测定的计算公式如下

标准条件下测定的回归方程为 $y = 0.00585x - 0.0027$ ；x为标准品浓度（nmol/mL），y为吸光值。

(1) 按样本蛋白浓度计算：

单位的定义：每mg组织蛋白每分钟产生1nmol对-硝基苯酚定义为一个酶活性单位。

$\alpha$ -GAL活性(nmol/min/mg prot)=[ $(\Delta A + 0.0027) \div 0.00585 \times V_{\text{反总}}$ ]  $\div$  (V样 $\times$ Cpr) $\div$ T

=39.89 $\times$ ( $\Delta A + 0.0027$ )  $\div$  Cpr

(2) 按样本鲜重计算：

单位的定义：每g组织每分钟产生1nmol对-硝基苯酚定义为一个酶活性单位。

$\alpha$ -GAL活性(nmol/min/g鲜重)=[ $(\Delta A + 0.0027) \div 0.00585 \times V_{\text{反总}}$ ]  $\div$  (W $\times$ V样 $\div$ V样总) $\div$ T

=39.89 $\times$ ( $\Delta A + 0.0027$ )  $\div$  W

(3) 按细菌或细胞密度计算：

单位的定义：每1万个细菌或细胞每分钟产生1nmol对-硝基苯酚定义为一个酶活性单位。

$\alpha$ -GAL活性(nmol/min/10<sup>4</sup>cell)=[ $(\Delta A + 0.0027) \div 0.00585 \times V_{\text{反总}}$ ]  $\div$  (500 $\times$ V样 $\div$ V样总) $\div$ T

=0.08 $\times$ ( $\Delta A + 0.0027$ )

V反总：反应体系总体积，0.07mL；V样：加入反应体系中样本体积，0.01mL；V样总：加入提取液体积，1mL；Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL；W：样本质量，g；500：细胞或细菌总数，500万；T：反应时间，30min。

b.用96孔板测定的计算公式如下

标准条件下测定的回归方程为 $y = 0.0039x - 0.0027$ ；x为标准品浓度（nmol/mL），y为吸光值。

(1) 按样本蛋白浓度计算：

单位的定义：每mg组织蛋白每分钟产生1nmol对-硝基苯酚定义为一个酶活性单位。

$\alpha$ -GAL活性(nmol/min/mg prot)=[ $(\Delta A + 0.0027) \div 0.0039 \times V_{\text{反总}}$ ]  $\div$  (V样 $\times$ Cpr) $\div$ T

=59.83 $\times$ ( $\Delta A + 0.0027$ )  $\div$  Cpr

(2) 按样本鲜重计算：

单位的定义：每g组织每分钟产生1nmol对-硝基苯酚定义为一个酶活性单位。

$\alpha$ -GAL活性(nmol/min/g鲜重)=[ $(\Delta A + 0.0027) \div 0.0039 \times V_{\text{反总}}$ ]  $\div$  (W $\times$ V样 $\div$ V样总) $\div$ T

=59.83 $\times$ ( $\Delta A + 0.0027$ )  $\div$  W

(3) 按细菌或细胞密度计算:

单位的定义: 每1万个细菌或细胞每分钟产生1nmol对-硝基苯酚定义为一个酶活性单位。

$$\begin{aligned}\alpha\text{-GAL活性(nmol/min/10^4\text{cell})} &= [(\Delta A + 0.0027) \div 0.0039 \times V_{\text{反总}}] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \\ &= 0.12 \times (\Delta A + 0.0027)\end{aligned}$$

V反总: 反应体系总体积, 0.07mL; V样: 加入反应体系中样本体积, 0.01mL; V样总: 加入提取液体积, 1mL; Cpr: 样本蛋白质浓度, mg/mL; W: 样本质量, g; 500: 细胞或细菌总数, 500万; T: 反应时间, 30min。